



水产学报
Journal of Fisheries of China
ISSN 1000-0615, CN 31-1283/S

《水产学报》网络首发论文

题目： 饲料中添加大豆皂苷对大菱鲆幼鱼生长和肠道健康的影响
作者： 余桂娟，杨沛，戴济鸿，欧伟豪，陈枳初，艾庆辉，张文兵，张彦娇，麦康森
网络首发日期： 2018-12-12
引用格式： 余桂娟，杨沛，戴济鸿，欧伟豪，陈枳初，艾庆辉，张文兵，张彦娇，麦康森. 饲料中添加大豆皂苷对大菱鲆幼鱼生长和肠道健康的影响[J/OL]. 水产学报. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1283.S.20181210.1635.002.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

饲料中添加大豆皂苷对大菱鲆幼鱼生长和肠道健康的影响

余桂娟¹, 杨沛¹, 戴济鸿¹, 欧伟豪¹, 陈枳初¹, 艾庆辉¹, 张文兵¹,
张彦娇^{1,2}✉, 麦康森^{1,2}

(1. 中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 农业部水产动物营养与饲料重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 山东 青岛 266235)

摘要 为研究大豆皂苷对大菱鲆幼鱼生长性能、消化酶活力、肠道组织结构完整性和肠道菌群结构的影响, 在以鱼粉为蛋白源的基础饲料中分别添加 0 %和 0.3 %的大豆皂苷, 配制成鱼粉组和大豆皂苷组两种等氮等脂的实验饲料, 投喂大菱鲆(4.63±0.01)g 进行 12 周的摄食生长实验。结果显示, 饲料中添加 0.3 %的大豆皂苷对大菱鲆的生长性能没有产生显著影响, 但显著降低了胃蛋白酶及肠淀粉酶活力; 两组实验中大菱鲆肠道组织形态无明显差异, 但大豆皂苷组肠道紧密连接蛋白 Occludin 的基因表达量显著降低。肠道菌群分析结果显示, 大菱鲆肠道中相对丰度最高的门和属分别为变形菌门和盐单胞菌属。LEfSe 和 MetaStat 分析显示, 饲料中添加大豆皂苷后显著提高了大菱鲆肠道内优势菌(变形菌门及希瓦氏菌属), 皂苷水解相关的肠道微生物(鞘脂单胞菌属、普氏菌属、栖瘤胃普雷沃菌以及普通拟杆菌)及潜在致病菌(莫氏杆菌属和发光菌属)的相对丰度, 同时显著降低了 *Caenimonas*、*Niastella* 和条件致病菌罗尔斯通菌属的相对丰度。研究表明, 0.3 %大豆皂苷抑制了大菱鲆消化酶活力及肠道紧密连接蛋白 Occludin 的基因表达, 且引起了大菱鲆肠道菌群结构的显著改变。因此大豆皂苷对鱼类肠道健康尤其是肠道菌群的影响不容忽视, 值得进一步研究。

关键词 大菱鲆; 大豆皂苷; 生长; 消化酶; 肠道组织结构; 肠道菌群

中图分类号 Q959.4

文献标志码 A

DOI: 10.11964/jfc.20180411243

Effects of dietary soyasaponins on the growth performance and intestinal health of juvenile turbot

YU Guijuan¹, YANG Pei¹, DAI Jihong¹, OU Weihao¹, CHEN Zhichu¹, AI Qinghui¹, ZHANG Wenbing¹, ZHANG Yanjiao^{1,2}✉, MAI Kangsen^{1,2}

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, and Key Laboratory of Aquaculture Nutrition and Feed, Ministry of Agriculture, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266235, China)

✉ZHANG Yanjiao. E-mail: yanjiaozhang@ouc.edu.cn

Abstract A 12-week feeding trial was conducted to investigate the effects of dietary soyasaponins on the growth performance, activities of digestive enzymes, intestinal morphology and intestinal bacterial community of turbot (*Scophthalmus maximus*). Two isonitrogenous and isolipidic experimental diets (based on 67 % fish meal) containing 0 % and 0.3 % soyasaponins were formulated. The results showed that the growth performance was not affected by dietary soyasaponins, while the activities of intestinal pepsin and amylase were significantly depressed by dietary 0.3 % soyasaponins.

Funding projects: China Agricultural Research System (CARS-47-G10); National Natural Science Foundation of China (41576137)

网络首发时间: 2018-12-12 11:06:35 网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1283.S.20181210.1635.002.html>

No obvious changes of intestinal histology were observed between two groups. But the gene expression of intestinal tight junction protein Occludin was significantly declined when 0.3 % soyasaponins was added. The analysis of intestine microbiota showed that Proteobacteria and *Halomonas* were the most dominant phylum and genus in turbot intestine, respectively. LEfSe and MetaStat analysis showed that the abundance of dominant bacteria (Proteobacteria and *Shewanella*) was significantly increased by dietary 0.3 % soyasaponins. Meanwhile, dietary soyasaponins significantly increased the abundance of intestinal saponin-hydrolyzing bacteria. In addition, the abundance of some intestinal potential pathogenic bacteria such as *Methylobacterium*, *Moraxella* and *Photobacterium*, was increased while that of some other pathogenic bacteria such as *Ralstonia* was decreased by dietary soyasaponins. In conclusion, dietary 0.3 % soyasaponins depressed the activities of digestive enzymes, and the gene expression of intestinal tight junction protein Occludin, and altered the intestinal microbiota of turbot. Thus, the effects of soyasaponins on fish intestine health, especially intestinal flora, cannot be ignored and deserved more study.

Key words *Scophthalmus maximus*; soyasaponins; growth performance; digestive enzymes; intestinal morphology; intestinal microbiota

豆粕(*Glycine max*)作为一种理想的植物蛋白源已经被广泛应用于水产饲料行业。然而,由于豆粕替代鱼粉超过一定剂量后对肉食性鱼类的生长及一些生理功能起到抑制作用,尤其是会诱发肠炎^[1],导致豆粕在肉食性鱼类饲料中的应用受到限制。而影响鱼类对豆粕利用的一个重要原因是豆粕中含有多种抗营养因子^[2]。大豆皂苷是一种热稳定性的抗营养因子,在豆粕中的含量为0.43%~0.67%^[3]。饲料中添加大豆皂苷会抑制鱼类生长,并造成肠道损伤已在多种鱼类中得到证实^[4-5],然而大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)上相关研究还未涉及。此外,研究表明大豆皂苷是引发鲑鳟鱼类(*Oncorhynchus*)豆粕诱发性肠炎的重要因素之一;其主要通过影响大西洋鲑(*Salmo salar*)后肠紧密连接蛋白的表达,破坏肠道黏膜屏障,改变肠道上皮细胞通透性,从而引发肠道炎症反应^[6]。肠道上皮细胞间的紧密连接结构在维持肠道结构完整性上起至关重要的作用。医学研究中认为紧密连接结构完整性的破坏是引起炎症性肠道疾病的主要原因^[7]。肠道紧密连接结构由一系列紧密连接蛋白包括跨膜蛋白 Occludin、Tricellulin、Claudin 家族、JAM 黏附连接分子和 Zonula occludens(ZOs)等组成,它们在维持肠道上皮旁转运,控制肠道通透性方面发挥重要作用^[8]。

肠道菌群稳态是肠道健康的重要组成部分。健康状况下,肠道菌群在宿主的生物学过程发挥一系列的促进作用,如帮助消化、促进黏膜系统的发育及作为一种保护屏障抵御疾病等^[9]。肠道菌群可以产生一系列消化酶如:淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶和蛋白酶,在代谢外源性物质方面发挥重要作用。肠道菌群失调与机体各种疾病如:炎性肠炎(IBD),代谢疾病,I型糖尿病,过敏症,哮喘及神经病学和心血管疾病等的发生密切相关^[10]。食物和养殖环境可以显著影响鱼类肠道菌群组成。鱼类肠道菌群在饲喂豆粕后发生了显著变化,研究表明其在豆粕诱发的肠道炎症中扮演重要角色^[11]。豆粕中的抗营养因子如大豆球蛋白^[12]和水苏糖^[13]等可以显著改变大菱鲆肠道部分菌群的相对丰度,但关于大豆皂苷对水产动物肠道菌群影响的的研究却鲜有涉及。

大菱鲆是典型的肉食性鱼类,具有生长快、肉质鲜美和经济价值高等优点,是我国重要的海水养殖鱼类。研究表明,饲料中添加45%及以上豆粕能够引起大菱鲆幼鱼肠道组织损伤并降低生长^[14];在此背景下,本研究通过在饲料中添加一定剂量的大豆皂苷研究其对大菱鲆生长,消化酶活力,肠道组织形态、肠道紧密连接蛋白基因表达以及肠道菌群结构的影响,以探究大豆皂苷的营养抗性,为植物蛋白在肉食性鱼类中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 饲料原料和配方

以鱼粉为主要蛋白源,鱼油和大豆卵磷脂为主要脂肪源,配制成44%粗蛋白和8%粗脂肪的两种等氮等脂的基础饲料。在基础饲料中添加0和0.3%的大豆皂苷(华北制药有限公司,石家庄,纯度为85%)(表1),分别命名为FM和SA 0.3。

配制饲料前,饲料原料经粉碎机粉碎后过80目筛,混合均匀后,加入鱼油和大豆卵磷脂(先溶解

大豆卵磷脂于鱼油中)手工将油脂颗粒搓散,再于混合机中混合均匀,最后加入约 30 %蒸馏水形成硬团,于 F(II)-26 螺杆压条机(华南理工大学,广州)中制成 3.0 mm 的颗粒状饲料,在 50 °C 烘箱中干燥 8 h,置于-20 °C 冰箱保存备用。

表1 实验饲料配方和主要营养成分(干重)
Tab. 1 Formulation and proximate composition of the experimental diets (dry matter) %

原料 ingredients	FM diet	SA 0.3
鱼粉 fish meal ¹	67.00	67.00
α -淀粉 α -starch ¹	16.00	16.00
鲱鱼油 herring oil ¹	3.50	3.50
大豆卵磷脂 soybean lecithin	0.50	0.50
氯化胆碱 choline chloride	0.30	0.30
维生素预混物 vitamin premix ²	1.00	1.00
矿物质预混物 mineral premix ³	0.50	0.50
磷酸钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0.50	0.50
Vc 磷酸酯 Vc phosphate	0.10	0.10
三氧化二钇 yttrium oxide	0.10	0.10
大豆皂苷 soyasaponins ⁴	0	0.30
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	10.50	10.20
饲料成分分析(%干重) nutrient composition (% dry matter)		
粗蛋白 crude protein	43.78	44.27
粗脂肪 crude lipid	8.49	8.31
灰分 ash	17.34	16.95

1. 鱼粉、 α -淀粉和鲱鱼油均购于青岛七好营养科技有限公司(青岛); 其中鱼粉: 粗蛋白 74 %, 粗脂肪 9.7 %。2. 维生素混合物(mg/kg diet): 维生素 B₁ 25 mg; 核黄素 45 mg; 维生素 B₆(盐酸吡哆醇) 20 mg; 维生素 B₁₂ 10 mg; 维生素 K₃ 10 mg; 肌醇 800 mg; 维生素 B₃(泛酸) 60 mg; 烟酸 200 mg; 叶酸 20 mg; 生物素(2%) 60 mg; 维生素 A 32 mg; 维生素 D₃ 5 mg; 维生素 E 240 mg; 乙氧基喹林 3 mg; 维生素 C 2000 mg; 微晶纤维素 6470 mg。3. 矿物质预混料(mg/kg diet): MgSO₄·7H₂O 1200 mg; CuSO₄·5H₂O 10 mg; FeSO₄·H₂O 80 mg; ZnSO₄·H₂O 50 mg; MnSO₄·H₂O 45 mg; CoCl₂·6H₂O(1 %) 50 mg; Ca(IO₃)₂(1%) 60 mg; Na₂SeO₃(1%) 20 mg; 沸石粉 3485 mg。4. 大豆皂苷: 购买于华北制药有限公司(石家庄, 中国), 大豆皂苷(85 %)、大豆蛋白(8.23 %)、大豆低聚糖(4.75 %)、水分(1.21 %)以及矿物质和异黄酮(0.81 %)

1. fish meal, α -starch and herring oil purchased from Qingdao Great Seven CO., LTD., (Qingdao, China); fish meal: crude protein: 74%, crude lipid: 9.7%. 2. vitamin premix (g/kg diet): V_{B1}, 25 mg; V_{B2} 45 mg; V_{B6} 20 mg; V_{B12} 10 mg; V_{K3}, 10 mg; inositol, 800 mg; V_{B3} 60 mg; nicotinic acid 200 mg; folic acid 20 mg; biotin 60 mg; V_A 32 mg; V_{D3} 5 mg; V_E 240 mg; ethoxyquinoline 3 mg; V_C phosphate 2000 mg; microcrystalline cellulose 6470 mg. 3. mineral premix (g/kg diet): MgSO₄ 1200 mg; CuSO₄·5H₂O 10 mg; FeSO₄·H₂O 80 mg; ZnSO₄·H₂O 50 mg; MnSO₄·H₂O 45 mg; CoCl₂·6H₂O (1 %) 50 mg; Ca(IO₃)₂ (1 %) 60 mg; Na₂SeO₃ (1 %) 20 mg; zeolite powder 3485 mg. 4. soyasaponins were supplied by North China Pharmaceutical Co., LTD., (Shijiazhuang, China), containing 85 % soybean saponins, 8.23 % soybean proteins, 4.75 % soybean oligosaccharides, 1.21 % moisture, 0.81 % minerals and isoflavones

1.2 饲养管理及样品采集

实验用大菱鲆幼鱼为当年人工培育的同一批苗种, 购于山东莱州大菱鲆养殖场, 实验在室内循环养殖系统中进行。实验前, 幼鱼用商业饲料(青岛七好营养科技有限公司, 青岛)暂养 2 周以适应养殖环境。正式养殖实验开始前, 将实验鱼禁食 24 h 后, 选择大小均匀、体格健壮的幼鱼[初始平均体质量(4.63±0.01)g], 随机分配于 6 个养殖桶中(200 L/桶, 每桶 30 尾, 2 个实验处理组, 每组 3 个重复), 每天表观饱食投喂 2 次(8:00, 18:30), 投喂结束后 30 min 吸出残饵和粪便, 养殖周期 12 周。养殖期间水温 15~19 °C, 盐度 24~26, 溶氧保持 >7 mg/L。

养殖结束后, 禁食 24 h 取样。每桶随机取 4 尾鱼, 保存于-20 °C, 用于体组成分析。每桶随机取 4 尾鱼, 取后肠去除内容物, 用生理盐水洗净, 放入波恩氏液中固定 24 h 后, 转移至 70 %酒精中长期保持, 用于组织学分析。每桶随机取 3 尾鱼, 测量其体质量、体长、内脏团质量及肝脏质量, 用以计算肥满度、脏体比和肝体比; 取后肠液氮速冻, 随后保存在-80 °C 超低温冰箱用于分析基因表达; 每桶随机取 5 尾鱼, 解剖出胃和肠道, 液氮速冻, 随后保存在-80 °C 超低温冰箱中, 用于消化酶活力分析。为研究肠道菌群, 每桶随机取 3 尾鱼, 用 70 %酒精的棉球擦拭鱼体表面, 在酒精灯周

围用无菌解剖工具解剖鱼体,取出后肠(去除幽门盲囊和盲肠)转移到 2 mL 无菌离心管中,液氮速冻,后保存于-80 °C超低温冰箱中。

1.3 鱼体组成和饲料组成分析

采用 AOAC 法^[15]分析鱼体和饲料常规组成。水分含量测定采用 105 °C 烘干恒重法(24 h);粗蛋白的测定为凯氏定氮法,采用 2300 型蛋白质自动分析仪(FOSS, 丹麦)分析;粗脂肪的测定采用 36680 型粗脂肪抽提仪(BUCHI 公司,瑞士),用索氏抽提法分析粗脂肪含量;粗灰分测定采用箱式电阻炉 550 °C 灼烧法(16 h)。

1.4 消化酶活力分析

胃蛋白酶活力分析参考 Anson 的方法^[16],并做部分改进。使用牛血红蛋白(Sigma 公司,美国)作为反应底物,用福林试剂(AppliChem 公司,德国)测定反应产物。将胃蛋白酶在 37 °C 下,1 min 内降解牛血红蛋白产生 1 μg 酪氨酸作为一个酶活力单位,用 U/mg 蛋白表示。

肠淀粉酶和胃淀粉酶活力测定参考 Hidalgo 等^[17]报道的淀粉酶活力测定方法,并在其基础上做部分改进。使用淀粉(Sigma 公司,美国)作为实验反应底物。将淀粉酶在 37 °C 下,30 min 内降解 10 mg 淀粉定义为一个酶活力单位,用 U/mg 蛋白表示。

1.5 组织学分析

按照组织切片的常规步骤制作组织切片,组织切片机切片,厚度为 5 μm;H.E 染色法染色,中性树胶封片。用 Nikon eclipse Ti-S 型号显微镜(Nikon, 日本)观察肠道组织学结构并拍照记录。

1.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

肠道总 RNA 提取参照 Trizol 试剂盒说明书(Takara, 日本)。使用 Nano-Drop®ND-1000 spectrophotometer(Nano-Drop Technologies, 美国)测定提取的 RNA 浓度,用 1.2 %琼脂糖凝胶来检测 RNA 质量。提取的总 RNA 用 Prime Script™ 反转录试剂盒(Takara, 日本)将上述提取到的 RNA 样品反转成 cDNA。用 DEPC 水进行 8 倍稀释后置于-20 °C 保存备用。

登录 NCBI 数据库,搜索大菱鲆 *Claudin-7*, *Claudin-4*, *Tricellulin*, *Occludin* 及内参基因 *β-actin*, 按照定量引物的设计原则使用 Primer Premier 5 软件设计特异性引物,并于生工生物工程(上海)股份有限公司(上海,中国)合成,所用引物见表 2。Real Time-PCR 实验使用实时定量 PCR 仪(Eppendorf, Germany)进行,实验体系为 2×SYBR® Premix Ex Taq™(TaKaRa, 日本)12.5 μL, Cdna (100 ng/μL)1 μL, dH₂O 10.5 μL, 引物 F(10 μmol/L) 0.5 μL; 引物 R(10 μmol/L) 0.5 μL。基本反应程序为:95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 20 s, 35 个循环。使用 2^{-ΔΔCT} 方法计算目的基因的相对表达量。

表2 qRT-PCR简并引物
Tab. 2 Primers used for qRT-PCR analysis

基因 genes	引物序列(5'-3') sequences of primers(5'-3')	退火温度 /°C annealing temperature	基因序列 accession number
Claudin-7	F: CTCCATCCTGCAGCTCAACA R: GGTGCACTTCATTCCCATGC	58	MF370858
Claudin-4	F: ATGTGGAGTGTGTCGGCTT R: AGACCTTGCACTGCATCTG	58	MF370857
Tricellulin	F: GCCTACATCCACAAAGACAACG R: TCATTCCCAGCACTAATAACAATCAC	58	KU238183.1
Occludin	F: ACTGGCATTCTTCATCGC R: GGTACAGATTCTGGCACATC	58	KU238182.1
β -actin	F: CGTGCGTGACATCAAGGAG R: AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	58	AY008305.1

1.7 肠道微生物 DNA 的提取、扩增和测序

肠道微生物提取步骤参照 QIAamp DNA Stool Mini Kit 说明书(Qiagen, 德国)。提取的微生物 DNA 的质量和浓度分别通过 1.2%的琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop ND-2000 超微量分光光度计进行检测(Thermo Scientific), 检测合格后, 使用带 Barcode 的引物(515F 和 806R), 采用 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs, 英国)对 16S *rRNA* 基因 V4 区进行扩增。扩增程序如下: 98 °C 预变性 1 min; 98 °C 变性 10 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 30 个循环; 72 °C 终延伸 5 min; 4 °C 保存。PCR 产物使用 2%浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 目的条带使用 Qiagen 公司提供的胶回收试剂盒回收产物(Qiagen, 德国)。使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建, 构建好的文库经过 Qubit 和 qRT-PCR 定量, 合格后于诺禾致源生物有限公司(诺禾致源, 天津)使用 HiSeq2500 PE250 进行上机测序。

1.8 肠道菌群数据统计分析

使用 QIIME pipeline (v.1.7.0), 根据样品均一化处理数据, 分析菌群 Alpha 多样性(Chao1 index, ACE, Shannon index 和 Simpson index)和 Beta 多样性(PCA 和 PCoA), 并使用 R 软件(v.2.15.3)绘制稀释曲线, 使用 *T* 检验方法分析 Alpha 多样性指数组间差异。使用 LEfSe 软件分析(默认设置 LDA Score 的筛选值为 4)获得不同处理组之间相对丰度具有统计学差异的 Bionarker 物种。Metastats 分析使用 R 软件(v.2.15.3), 检测组间的 permutation test, 得到不同分类水平的物种在不同处理组之间的相对丰度的差异性统计结果。

1.9 数据计算与统计

生长指标计算公式:

存活率(survival rate, SR, %)=实验结束时鱼尾数/实验开始鱼尾数×100

增重率(weight gain rate, WGR, %)=100×(鱼体末体质量-鱼体初始体质量)/鱼体初始体质量

特定生长率(specific growth rate, SGR, %/d)=100×(ln 鱼体末体质量-ln 鱼体初始体质量)/饲养天

数

摄食率(feed intake, FI, %/d)=100×平均摄食饲料量/ [(鱼体初始体质量+鱼体末体质量)/2]/饲养天

数

饲料效率(feed efficiency, FE, %)=鱼体增重/平均摄食饲料量

肥满度(condition factor, CF, g/cm³)=平均体质量/平均体长³

肝体比(hepatosomatic index, HSI, %)=100×肝脏质量/全鱼体质量

脏体比(viscerasomatic index, VSI, %)=100×内脏质量/体质量

实验所得数据采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), $P<0.05$ 表示差异显著; 统计结果以平均值±标准误(mean±SE)的形式表示。

2 结果

2.1 饲料中添加 0.3 %大豆皂苷对大菱鲆生长性能的影响

饲料中添加 0.3 %的大豆皂苷对大菱鲆幼鱼的各项生长指标均无显著性影响(表 3)。

表3 饲料中添加0.3%的大豆皂苷对大菱鲆幼鱼生长性能的影响
Tab. 3 Effects of dietary 0.3 % soyasaponins on the growth performance of juvenile turbot

生长指标 growth indicators	FM diet	SA 0.3 diet
初始体质量/g initial weight	4.60±0.06	4.63±0.02
末体质量/g final weight	23.57±2.42	26.29±1.14
存活率/% survival	100±0	100±0
增重率/% weight gain rate	4.08±0.68	4.68±0.27
特定增长率/(%/d) specific growth rate	1.92±0.17	2.07±0.06
饲料效率/% feed efficiency	1.11±0.09	1.19±0.06
摄食率/(%/d) feed intake	1.19±0.06	1.40±0.05
肥满度/(g/cm ³) condition factor	1.81±0.28	1.98±0.14
肝体比/% hepatosomatic index	0.85±0.25	0.98±0.23
脏体比/% viscerasomatic index	4.45±0.38	4.61±0.53

2.2 饲料中添加 0.3 %大豆皂苷对大菱鲆体成分的影响

饲料中添加 0.3 %大豆皂苷显著增加了鱼体粗脂肪含量($P<0.05$), 降低了鱼体灰分含量($P<0.05$), 而对鱼体的水分及粗蛋白含量无显著影响。

表4 饲料中添加0.3%的大豆皂苷对大菱鲆幼鱼体组成的影响
Tab. 4 Effects of dietary 0.3 % soyasaponins on whole body composition of juvenile turbot

体组成/% body composition	FM diet	SA 0.3
水分/% moisture	76.10±0.23	76.00±0.26
粗蛋白/% crude protein	15.86±0.19	15.84±0.30
粗脂肪/% crude lipid	4.45±0.14	4.67±0.20*
灰分/% ash	3.78±0.17	3.49±0.14*

表示有显著性差异($P<0.05$); 下同“” means significant difference($P<0.05$), the same blew

2.3 饲料中添加 0.3 %大豆皂苷对大菱鲆消化酶活力的影响

饲料中添加 0.3 %的大豆皂苷显著抑制了大菱鲆幼鱼的胃蛋白酶和肠淀粉酶活力($P<0.05$), 而对胃淀粉酶活力无显著影响(表 5)。

表5 饲料中添加0.3%的大豆皂苷对大菱鲆幼鱼消化酶活力的影响
Tab. 5 Effects of dietary 0.3 % soyasaponins on digestive enzyme activities of juvenile turbot

消化酶活力 digestive enzyme activity	FM diet	SA 0.3
胃蛋白酶酶活/(U/mg prot) pepsin activity	49.76±2.86	28.55±3.38*
胃淀粉酶/(U/mg prot) stomach amylase activities	0.36±0.15	0.41±0.26
肠淀粉酶/(U/mg prot) intestinal amylase activities	0.27±0.02	0.08±0.02*

2.4 饲料中添加 0.3 %的大豆皂苷对大菱鲆肠道组织形态的影响

与鱼粉组相比, 饲料中添加 0.3 %大豆皂苷并没有影响大菱鲆后肠组织结构完整性。肠道上皮细

胞核均位于细胞基部且排列整齐，杯状细胞数量无明显变化；固有层均未出现增宽、炎性细胞浸润现象(图 1)。



图 1 大菱鲂幼鱼后肠组织结构图

1 和 2 分别对应对照组和大豆皂苷组大菱鲂肠道组织切片；红色箭头示肠道上皮细胞微绒毛；“*”示肠道绒毛固有层；“G”示杯状细胞

Fig.1 Distal histological sections of juvenile turbot

1 and 2 represented the distal histological section of control and SA 0.3 group respectively; Red arrows showed the microvilli of intestine epithelium cells; “*”showed the lamina propria within the intestinal folds; “G”showed the goblet cell.

2.5 饲料中添加 0.3 % 的大豆皂苷对大菱鲂幼鱼肠道紧密连接蛋白相关基因表达的影响

饲料中添加 0.3 % 的大豆皂苷对大菱鲂幼鱼肠道紧密连接蛋白 *Claudin-7*、*Claudin-4*、*Tricellulin* 的基因表达量均无显著性影响，而显著降低了 *Occudin* 的基因表达($P < 0.05$)(图 2)。

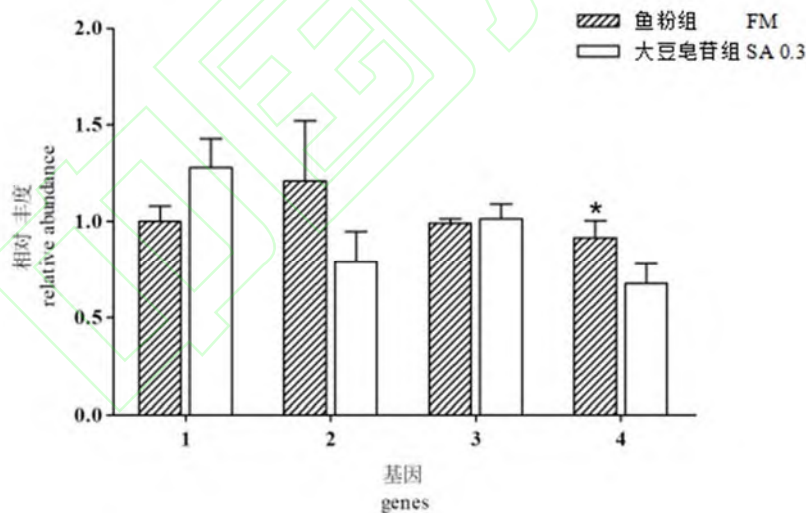


图 2 饲料中添加 0.3% 的大豆皂苷对大菱鲂幼鱼后肠紧密连接蛋白相关基因表达的影响

1. Claudin-7, 2. Claudin-4, 3. Tricellulin, 4. Occludin, “*”表示有显著性差异($P < 0.05$);下同

Fig.2 Effects of dietary 0.3 %soyasaponins on genes expression of intestinal tight junction-related proteins in the distal intestine of juvenile turbot

1.Claudin-7, 2. Claudin-4, 3. Tricellulin, 4. Occludin; colume with“*” means significant difference ($P < 0.05$); the same blew

2.6 饲料中添加 0.3 % 大豆皂苷对肠道菌群的影响

经过拼接、过滤和裁剪，两处理组共获得 320 995 条 clean reads，平均每个样品 53 499 条。将上述序列与 Green Gene 数据库比对，6 个样品共产生 9 852 个 OTUs，其中 FM 组共产生 5 394 个

OTUs, SA 0.3 共产生 4 458 个 OTUs。

本实验中, 大菱鲆肠道微生物在门水平上的主要类群为变形菌门(Proteobacteria), 厚壁菌门(Firmicute)和放线菌门(Actionobacteria); 属水平上, 盐单胞菌属(*Halomonas*)和希瓦氏菌属(*Shewanella*)为丰度最高的属(图 3)。饲料中添加 0.3 %大豆皂苷对大菱鲆肠道菌群 α -多样性无显著影响(表 6)。PCA(Principal Component Analysis)分析显示大豆皂苷组肠道菌群出现了明显的食物聚类(图 4)。

LEfSe 分析显示, 饲料中添加 0.3 %大豆皂苷影响了大菱鲆肠道菌群不同分类学水平上物种的相对丰度; 变形菌门, 杆菌纲(Bacilli), 芽胞杆菌目(Bacillales), 芽胞杆菌科(Bacillaceae)的相对丰度在 0.3 %大豆皂苷组中显著增加($P<0.05$)(图 5)。

MetaStat 分析显示, 饲料中添加 0.3 %大豆皂苷显著增加了希瓦氏菌属、鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、副球菌属(*Paracoccus*)、普氏菌属(*Prevotella*)、栖瘤胃普雷沃菌(*Prevotella_ruminicola*)和普通拟杆菌(*Bacteroides_vulgatus*)以及潜在致病菌莫氏杆菌属(*Moraxella*)和发光菌属(*Photobacterium*)的相对丰度; 显著降低了 *Caenimonas*, *Niastella* 和罗尔斯通菌属(*Ralstonia*)的相对丰度($P<0.05$)(图 6)。

表6 大菱鲆幼鱼后肠菌群 α -多样性指数统计表
Tab. 6 Alpha diversity index of microbial community in distal intestine of juvenile turbot

组别 groups	菌群丰富度 richness estimates		菌群多样性 diversity estimates		
	Chao1 指数 Chao1	物种丰富度指数 ACE	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	
FM	1989±445	2011±443	6.85±1.43		0.88±0.06
SA 0.3	1563±258	1619±257	4.77±0.30		0.78±0.02

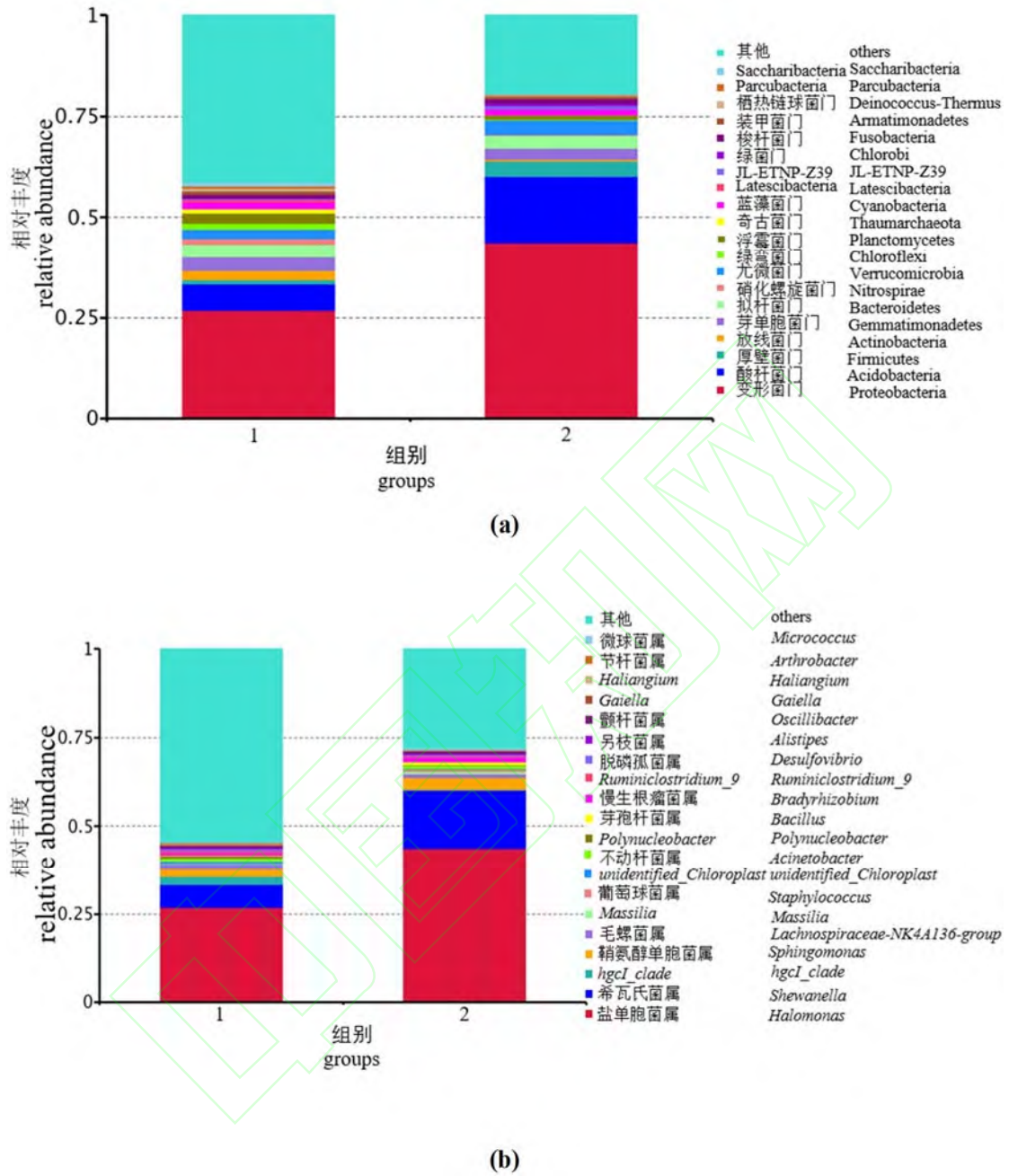


图3 各个处理组大菱鲆幼鱼后肠肠道菌群在门(a)和属(b)水平上 TOP 20
1. FM, 2. SA 0.3

Fig.3 Top 20 phylum (a) and genus (b) of microbial community in juvenile turbot distal intestine of each treatment group
1. FM, 2. SA 0.3

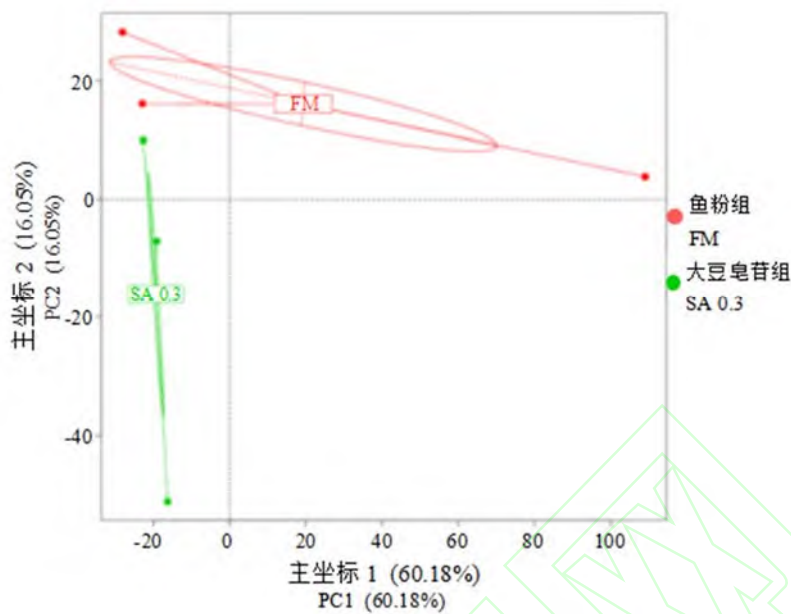


图4 大菱鲆幼鱼后肠道菌群 PCA 分析
基于 OTUs 绘制的 PCA 主成分分析图，红色代表鱼粉组，绿色代表大豆皂苷组

Fig.4 PCA analysis of distal intestine microbiota of juvenile turbot

PCA (principal component analysis) based on OTUs, Red label on behalf FM diet, green on behalf SA 0.3 diet.

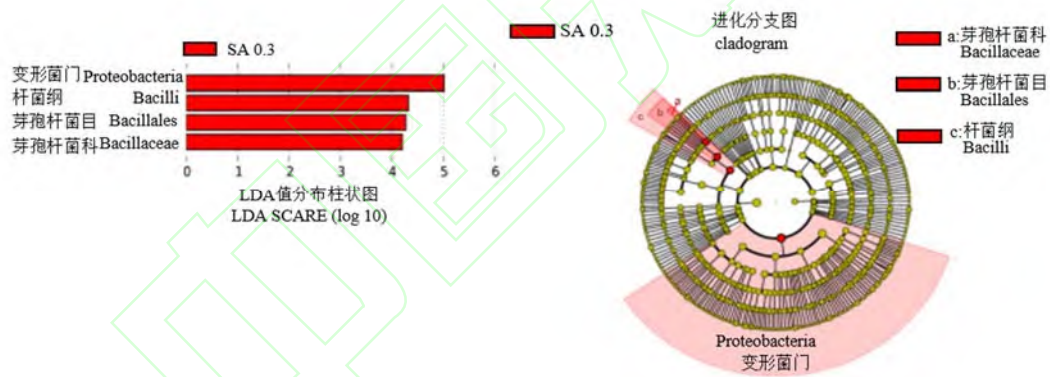


图5 大菱鲆幼鱼肠道菌群结构 LefSe 分析

LDA 值分布柱状图(左)展示了 LDA Score 大于设定值(默认设置为 4)的物种，即组间具有统计学差异的物种。柱状图的长度代表差异物种的影响大小(即为 LDA Score)；进化分支图(右)由内至外辐射的圆圈代表了由门至属(或种)的分类级别。在不同分类级别上的每一个小圆圈代表该水平下的一个分类，小圆圈直径大小与相对丰度大小呈正比。着色原则：无显著差异的物种统一着色为黄色，差异物种 Biomarker 跟随组进行着色，红色节点表示在红色组别中起到重要作用的微生物类群，绿色节点表示在绿色组别中起到重要作用的微生物类群。图中英文字母表示的物种名称在右侧图例中进行展示

Fig.5 LefSe analysis of microbiota in juvenile turbot distal intestine

LDA score distribution bar graph (left) showed the species whose LDA score greater than set value (the default screening value was 4), that was differentiated species. The length of the column represented the extent of the influence to specific species. Cladogram (right): The identified OTUs are distributed according to phylogenetic characteristics around the circle. The dots closest to the center represent OTUs on phylum level, whereas those locating on the outermost circle stand for OTUs on genus level, and the diameter of dots is proportional to the taxon's abundance. The color of the dots and sectors indicate enrichment of the OTUs in different diets (yellow, undifferentiated species; red, SA 0.3 diet; green, FM diet). The colored sectors given information on phylum, class, order, family, and genus are indicated by letters, which are specified on the top right corner (full name, given only for those showing significant difference between diets)

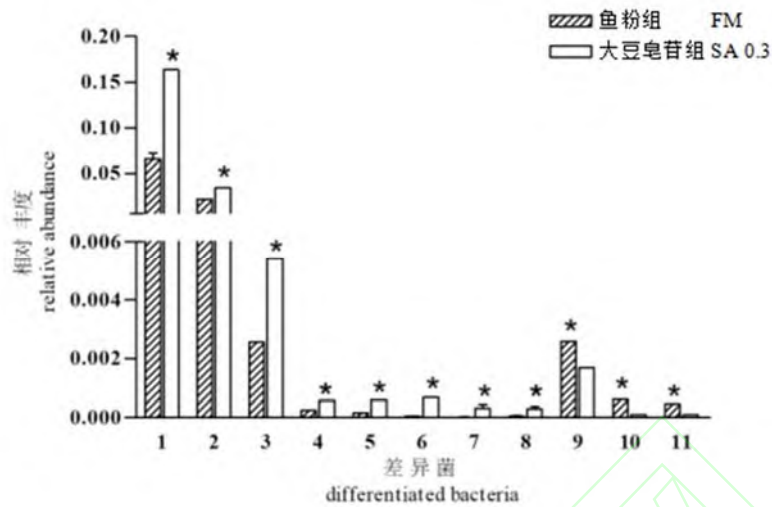


图6 大菱鲆幼鱼后肠肠道菌群 MetaStat 分析

1. 希瓦氏菌属, 2. 鞘脂单胞菌属, 3. 副球菌属, 4. 莫氏杆菌属, 5. 发光菌属, 6. 普氏菌属, 7. 栖瘤胃普雷沃菌, 8. 普通拟杆菌, 9. *Caenimonas*, 10. *Niastella*, 11. 罗尔斯通菌属

Fig.6 MetaStat analyse of distal intestine microbial community of juvenile turbot

1. *Shewanella*, 2. *Sphingomonas*, 3. *Paracoccus*, 4. *Moraxella*, 5. *Photobacterium*, 6. *Prevotella*, 7. *P. ruminicola*, 8. *B. vulgatus*, 9. *Caenimonas*, 10. *Niastella*, 11. *Ralstonia*

3 讨论

在本实验中, 饲料中添加 0.3 % 的大豆皂苷对大菱鲆的生长性能, 包括增重率、摄食率和饲料利用效率均没有产生显著影响。Chen 等^[4]研究表明大豆皂苷对鱼类生长的影响与养殖周期及其含量密切相关; 用含 0.32 % 的大豆皂苷的饲料饲养牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 28 d 后, 牙鲆的摄食和生长受到显著抑制, 而 56 d 时鱼体生长及摄食率与对照组并没有显著差异, 但当饲料中大豆皂苷含量增加到 0.64 % 时, 牙鲆的生长显著降低。其结果表明大豆皂苷对鱼体的不良影响可被长时间的养殖所缓解, 但超过一定剂量会对鱼体造成不可逆损伤。异育银鲫 (*Allogynogenetic silver crucian carp*) 上的研究也表明, 高剂量的大豆皂苷 (0.72 %) 会对异育银鲫的生长造成不可逆的抑制作用^[18]。此外, 基础饲料中主要蛋白源的来源对大豆皂苷的抗营养作用也会产生不同的影响。研究表明, 在以鱼粉为主要蛋白源的饲料中添加 0.2 % 大豆皂苷, 大西洋鲑的生长性能及对营养物质(蛋白质和脂质)的消化与对照组无显著差异^[19]。而在含植物蛋白源饲料中添加 0.2 % 大豆皂苷, 大西洋鲑对脂质及氨基酸的消化普遍受到影响^[20]。本实验的基础饲料配方是以鱼粉为主要蛋白源, 鱼粉中含有的一些诱食因子或生物活性因子会在一定程度上降低大豆皂苷带来的负面影响。此外, 实验鱼的种类、发育阶段以及养殖时间等也都会产生影响。

鱼类的生长与鱼体对营养物质的消化吸收功能密切相关, 因此进行消化酶活力的研究可以预测和评估鱼体对饲料中蛋白等营养物质的消化吸收能力。尽管有研究表明养殖鱼类对皂苷有一定的忍受程度, 饲料中添加量小于 0.1% 的皂苷一般不会影响养殖鱼类的正常生长^[21]。但是大豆皂苷具有抑制多种酶活力的功效^[21]。米海峰^[22]的研究显示, 牙鲆胰蛋白酶、肠道胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和肠道胰凝乳蛋白酶活性随着饲料中大豆皂苷添加量(0.1 %、0.4 % 及 0.8 %) 的增加显著降低。Francis^[2]等研究表明, 皂苷能抑制糜蛋白酶和胆碱脂酶活性, 影响动物对蛋白质的消化与利用。与前述实验结果相似, 在饲料中添加 0.3 % 大豆皂苷显著降低了大菱鲆胃蛋白酶和肠淀粉酶的活力, 说明添加 0.3 % 大豆皂苷影响了大菱鲆对营养物质的消化; 然而在 12 周的养殖周期内大菱鲆的生长没有显著降低, 这可能与鱼的种类和养殖时间有关。

大豆皂苷能够降低体内过氧化脂质的生成, 减少体内脂肪含量, 具有降脂效果^[18]。陈伟^[23]的研

研究表明饲料中添加 0.32 %大豆皂苷显著降低了牙鲈鱼体的粗脂肪含量；大西洋鲑上的研究也表明大豆皂苷具有降胆固醇效果^[24]。但异育银鲫上的研究发现饲料中添加大豆皂苷对鱼体粗脂肪含量并没有显著影响^[18]。而在尼罗罗非鱼饲料中添加 300 mg/kg 皂树皂苷(*Quillaja saponins*)却显著增加了肌肉中脂肪含量^[25]。Chavali 等^[26]提到皂苷可能会增加老鼠(*Muroidea*)体外脾细胞胆固醇的从头合成。在本实验中, 饲料中添加 0.3 %大豆皂苷显著提高了鱼体粗脂肪含量, 其原因是否与大豆皂苷促进了胆固醇的从头合成有关, 值得进一步研究。

肠道组织切片结果显示, 饲料中添加 0.3 %大豆皂苷对大菱鲂肠道组织没有造成明显的损伤; 但肠道紧密连接蛋白 Occludin 的基因表达量在大豆皂苷添加组显著下降。紧密连接结构是一种动态的、多蛋白复合物, 它作为一种选择性/半渗透性的细胞间屏障可以控制肠道屏障通透性。而 Occludin 是紧密连接复合物中的主要部分^[27]。大西洋鲑鱼上的研究表明, 大豆皂苷可以通过增加后肠上皮细胞的通透性来破坏肠道完整性^[28]。本实验中大菱鲂后肠紧密连接蛋白 Occludin 的基因表达量在 0.3 %大豆皂苷组显著下降, 表明 0.3 %的大豆皂苷对大菱鲂肠道通透性可能具有一定的破坏作用。

本实验中, 大菱鲂的肠道优势菌在门水平上主要为变形菌门、厚壁菌门和放线菌门, 在属水平上主要为盐单胞菌属和希瓦氏菌属, 这与之之前在大菱鲂上的研究结果相似^[12]。饲料中添加 0.3 %的大豆皂苷后大菱鲂肠道的优势菌组成发生了显著变化, 变形菌门和希瓦氏菌属的相对丰度显著提高, 而且出现了明显的食物聚类现象, 可见饲料中添加 0.3 %的大豆皂苷改变了大菱鲂肠道菌群的整体结构。此外, 饲料中添加 0.3 %的大豆皂苷还显著增加了变形菌门中鞘脂单胞菌属, 厚壁菌门的杆菌纲、芽胞杆菌目和芽胞杆菌科, 拟杆菌门的普氏菌属、栖瘤胃普雷沃菌以及普通拟杆菌的丰度。研究发现鞘脂单胞菌属具有产 β -葡萄糖苷酶的能力^[29]、厚壁菌门的杆菌纲中也含有大量产 β -葡萄糖苷酶的细菌、拟杆菌属细菌也具有产糖苷酶和 β -葡萄糖醛酸酶活性^[30], 而肠道细菌产生的糖苷酶^[31]和葡萄糖醛酸酶^[32]可参与大豆皂苷的水解。还有研究表明拟杆菌门的普雷沃氏菌(*Prevotella oris*)具有水解皂苷类化合物的性质^[33]。这些结果表明大豆皂苷很可能提高了大菱鲂肠道内与皂苷类水解有关的肠道微生物的相对丰度。在本实验中, 大豆皂苷显著降低了 *Caenimonas*, *Niastella* 和罗尔斯通菌属的相对丰度, 这其中罗尔斯通菌属含有多种条件致病菌, 可引起人类感染脑膜炎, 骨髓炎等^[34], 其他两种菌的相关研究还未见报道, 但已有的研究指出皂苷能抑制金黄色酿脓葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)活性^[35], 所以大豆皂苷可能通过其抑菌性来降低潜在致病菌的相对丰度。此外, 大豆皂苷还显著提高了潜在致病菌如莫氏杆菌属和发光菌属的丰度^[36-37]。众所周知肠道共生菌中潜在致病菌与益生菌的失调会破坏肠道稳态, 诱发多种肠道疾病^[38], 而潜在致病菌的相对丰度显著变化对肠道健康存在隐患。本研究中, 0.3%大豆皂苷对大菱鲂肠道菌群结构具有显著调节作用, 其与肠道菌群结构的关系值得进一步研究。

综上所述, 饲料中添加 0.3 %大豆皂苷显著抑制了大菱鲂的消化酶活性, 降低了紧密连接蛋白 Occludin 的基因表达量, 改变了肠道菌群结构, 在抑制了一些潜致病菌的相对丰度的同时也增加了部分潜在致病菌的相对丰度。因此, 大豆皂苷对大菱鲂肠道健康的影响不容忽视, 在鱼类饲料中使用植物蛋白源需考虑其中皂苷的含量。

参考文献:

- [1] Krogdahl Å, Bakke-McKellep A M, Baeverfjord G. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2003, 9(6): 361-371.
- [2] Francis G, Makkar H P S, Becker K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish[J]. *Aquaculture*, 2001, 199(3-4): 197-227.
- [3] Ireland P A, Dziedzic S Z, Kearsley M W. Saponin content of soya and some commercial soya products by means of high-performance liquid chromatography of the saponins[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1986, 37(7): 694-698.
- [4] Chen W, Ai Q H, Mai K S, et al. Effects of dietary soybean saponins on feed intake, growth performance, digestibility and intestinal structure in juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Aquaculture*, 2011, 318(1-2): 95-100.
- [5] Bureau D P, Harris A M, Cho C Y. The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Aquaculture*, 1998, 161(1-4): 27-43.
- [6] Krogdahl A, Gajardo K, Kortner T M, et al. Soy saponins induce enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(15): 3887-3902.
- [7] Camilleri M, Madsen K, Spiller R, et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease[J]. *Neurogastroenterology & Motility*, 2012, 24(6): 503-512.

- [8] Kosińska A, Andlauer W. Modulation of tight junction integrity by food components[J]. Food Research International, 2013, 54(1): 951-960.
- [9] Ringø E, Myklebust R, Mayhew T M, et al. Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry[J]. Aquaculture, 2007, 268(1-4): 251-264.
- [10] Blumberg R, Powrie F. Microbiota, disease, and back to health: A metastable journey[J]. Science Translational Medicine, 2012, 4(137): 137rv7.
- [11] Reveco F E, Øverland M, Romarheim O H, et al. Intestinal bacterial community structure differs between healthy and inflamed intestines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. Aquaculture, 2014, 420-421: 262-269.
- [12] Li Y X, Yang P, Zhang Y J, et al. Effects of dietary glycinin on the growth performance, digestion, intestinal morphology and bacterial community of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L.[J]. Aquaculture, 2017, 479(1): 125-133.
- [13] Yang P, Hu H B, Liu Y, et al. Dietary stachyose altered the intestinal microbiota profile and improved the intestinal mucosal barrier function of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L.[J]. Aquaculture, 2018, 486(3): 98-106.
- [14] Peng M, Xu W, Ai Q H, et al. Effects of nucleotide supplementation on growth, immune responses and intestinal morphology in juvenile turbot fed diets with graded levels of soybean meal (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. Aquaculture, 2013, 392-395: 51-58.
- [15] AOAC. Official Methods of Analysis[M]. 16th ed. Washington DC: Association of Official Agricultural Chemists, 1995.
- [16] Anson M L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin[J]. Journal of General Physiology, 1938, 22(1): 79-89.
- [17] Hidalgo M C, Urea E, Sanz A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities[J]. Aquaculture, 1999, 170(3): 267-283.
- [18] 张伟. 大豆皂甙与大豆异黄酮对异育银鲫生长、生理及肠道健康的影响[D]. 苏州: 苏州大学, 2010.
Zhang W. Effects of soybean saponins and soybean isoflavones on growth, physiology and intestinal health of *Allogynogentic silver crucian carp*[D]. Suzhou: Soochow University, 2010 (in Chinese).
- [19] Sørensen M, Penn M, El-Mowafi A, et al. Effect of stachyose, raffinose and soya-saponins supplementation on nutrient digestibility, digestive enzymes, gut morphology and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L)[J]. Aquaculture, 2011, 314(1-4): 145-152.
- [20] Chikwati E M, Venold F F, Penn M H, et al. Interaction of soya-saponins with plant ingredients in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* L.[J]. British Journal of Nutrition, 2012, 107(11): 1570-1590.
- [21] Liener I E. Implications of antinutritional components in soybean foods[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1994, 34(1): 31-67.
- [22] 米海峰. 不同蛋白源和大豆抗营养因子对牙鲆蛋白消化酶的活性与基因表达的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
Mi H F. Effects of different protein sources and antinutritional factors on gene expression and activity of protein-digestive-enzyme of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008 (in Chinese).
- [23] 陈伟. 抗营养因子对牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 利用大豆蛋白源的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
Chen W. Effects of antinutritional factors on the utilization of soybean proteins by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009 (in Chinese).
- [24] Gu M, Kortner T M, Penn M, et al. Effects of dietary plant meal and soya-saponin supplementation on intestinal and hepatic lipid droplet accumulation, lipoprotein and sterol metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. British Journal of Nutrition, 2014, 111(3): 432-444.
- [25] Francis G, Makkar H P S, Becker K. Effects of *Quillaja* saponins on growth, metabolism, egg production and muscle cholesterol in individually reared Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2001, 129(2): 105-114.
- [26] Chavali S R, Francis T, Campbell J B. An *in vitro* study of immunomodulatory effects of some saponins[J]. International Journal of Immunopharmacology, 1987, 9(6): 675-683.
- [27] Johnson L G. Applications of imaging techniques to studies of epithelial tight junctions[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005, 57(1): 111-121.
- [28] Knudsen D, Jutfelt F, Sundh H, et al. Dietary soya saponins increase gut permeability and play a key role in the onset of soyabean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. British Journal of Nutrition, 2008, 100(1): 120-129.
- [29] Kyum K M, Lee J W, Lee K Y, et al. Microbial conversion of major ginsenoside Rb₁ to pharmaceutically active minor ginsenoside Rd[J]. Journal of Microbiology, 2005, 43(5): 456-462.
- [30] Hu J. Characterization of soya-saponin metabolism by human gut microorganisms and bioavailability in humans[D]. Ames: Iowa State University, 2003.
- [31] Gestetner B, Birk Y, Tencer Y. Soybean saponins. Fate of ingested soybean saponins and the physiological aspect of their hemolytic activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1968, 16(6): 1031-1035.
- [32] Jang I S, Kim D H. Purification and characterization of α -L-Rhamnosidase from *Bacteroides* JY-6, a human intestinal bacterium[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1996, 19(12): 1546-1549.
- [33] Hasegawa H, Sung J H, Benno Y. Role of human intestinal *Prevotella oris* in hydrolyzing ginseng saponins[J]. Planta Medica, 1997, 63(5): 436-440.
- [34] Ryan M R, Adley C C. *Ralstonia* spp.: emerging global opportunistic pathogens[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2014, 33(3): 291-304.
- [35] Khan H, Khan M A, Abdullah. Antibacterial, antioxidant and cytotoxic studies of total saponin, alkaloid and sterols contents of decoction of Joshanda: Identification of components through thin layer chromatography[J]. Toxicology and Industrial Health, 2015, 31(3): 202-208.
- [36] Osorio C R, Toranzo A E, Romalde J L, et al. Multiplex PCR assay for *ureC* and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2000, 40(3): 177-183.
- [37] Oldfield N J, Ala'Aldeen D A A. Neisseria and moraxella: Meningitis; septicaemia; gonorrhoea; respiratory infections[M]//Greenwood D, Slack R, Barer M, et al. Medical Microbiology (Eighteenth Edition). 18th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2012: 256-264.
- [38] Maranduba C M, De Castro S B, de Souza G T, et al. Intestinal microbiota as modulators of the immune system and neuroimmune system: Impact on the host health and homeostasis[J]. Journal of Immunology Research, 2015, 2015(1): 1-14.